

BLOOD CHOLESTEROL LOWERING COMPOSITION

Patent number: JP2002114694
Publication date: 2002-04-16
Inventor: KONO MITSUTAKA; HIROTSUKA MOTOHIKO; AOYAMA TOSHIKI; HASHIMOTO YUKIO; KITO MAKOTO
Applicant: FUJI OIL CO LTD
Classification:
- **international:** A61K35/78; A23J3/34; A23L1/305; A61K38/16; A61K38/00; A61P3/06
- **europaean:**
Application number: JP20000301018 20000929
Priority number(s):

Abstract of JP2002114694

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a soy protein component for safely and efficiently lowering the blood cholesterol level and useful as pharmaceuticals, foods or drinks for the prevention and treatment of the increase in blood cholesterol level.

SOLUTION: This blood cholesterol lowering composition contains a low phytic acid soy protein composed mainly of 11S globulin as an active component. The content of the 11S protein is $\geq 70\%$ and that of phytin is $\leq 0.2\%$ based on the protein. The blood cholesterol lowering composition is produced from soybean having a 11S globulin content of $\geq 60\%$ based on the total protein in the bean by treating the soy protein with a phytic acid decomposing enzyme without adding a reducing agent in the production process.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Patent Abstracts of Japan

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-114694
(P2002-114694A)

(43) 公開日 平成14年4月16日 (2002.4.16)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
A 6 1 K 35/78		A 6 1 K 35/78	J 4 B 0 1 8
A 2 3 J 3/34		A 2 3 J 3/34	4 C 0 8 4
A 2 3 L 1/305		A 2 3 L 1/305	4 C 0 8 8
A 6 1 K 38/16		A 6 1 P 3/06	
38/00		A 2 3 J 3/16	
審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 6 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-301018 (P2000-301018)

(22) 出願日 平成12年9月29日 (2000.9.29)

(71) 出願人 000236768
不二製油株式会社
大阪府大阪市中央区西心斎橋2丁目1番5号
(72) 発明者 河野 光登
茨城県筑波郡谷和原村網の台4丁目3番地
不二製油株式会社つくば研究開発センタ
ー内
(72) 発明者 廣塚 元彦
茨城県筑波郡谷和原村網の台4丁目3番地
不二製油株式会社つくば研究開発センタ
ー内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血中コレステロール低減用組成物

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 安全かつ効率的に血中のコレステロール濃度を低減させることを目的として、医薬又は飲食品タイプとして血中のコレステロール上昇の予防、治療に有用な大豆蛋白質成分の提供。

【解決手段】 11Sグロブリンを主成分とした低フィチン酸大豆蛋白質を有効成分とする血中コレステロール低減用組成物。上記組成物において、11Sグロブリンを蛋白質当たり70%以上含有し、フィチン含量は、蛋白質当たり0.2%以下である。該血中コレステロール低減用組成物は、11Sグロブリンが種子中の全蛋白質量の60%以上含む大豆より作製し、大豆蛋白質にフィチン酸分解酵素を作用させて得られ、又その製造工程において還元剤を添加しないで作製されたものである。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 11Sグロブリンを主成分とした低フィチン酸大豆蛋白質を有効成分とする血中コレステロール低減用組成物。

【請求項2】 蛋白質当たり11Sグロブリンを70%以上含有した請求項1記載の血中コレステロール低減用組成物。

【請求項3】 フィチン含量が、蛋白質当たり0.2%以下である請求項1記載の血中コレステロール低減用組成物。

【請求項4】 大豆蛋白質にフィチン酸分解酵素を作用させて得られたものである請求項1または2記載の血中コレステロール低減用組成物。

【請求項5】 11Sグロブリンが種子中の全蛋白質量の60%以上含む大豆より作製した請求項1記載の血中コレステロール低減用組成物。

【請求項6】 その製造工程において還元剤を添加しないで作製された請求項1の血中コレステロール低減用組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は血中のコレステロール低減用組成物、さらに詳しくは、大豆蛋白質から分画された生理活性成分のひとつを主成分とし、さらにその効果を高める処理が施された血中のコレステロール低下能画分に関する。

【0002】

【従来の技術】大豆蛋白質は植物性蛋白質の中で栄養性が優れているだけでなく、近年では様々な生理活性効果が見い出され、生理機能剤としても注目される食品素材である。大豆タンパク質の持つ血中コレステロール低下能についてはよく知られており、それは大豆タンパク質のある成分が、コレステロールの原因となる胆汁酸等と特異的に結合し、そのまま糞便として排泄されると言われている。さらに、このコレステロール低下の効果を唄った食品が厚生省許可特定保健用食品にもなっている（大豆プロテイン食品；“大豆からあげ”不二製油株式会社）。このコレステロール低下能をはじめとする生理機能は上述の様に、大豆タンパク質の中のある特定の画分から発現されると考えられ、大豆タンパク質成分から得られた各生理機能画分を、効率よく精製することは安全性のきわめて高い医薬品素材としてだけでなく、食品用素材として利用する上で重要な因子である。

【0003】ペプチド成分としてのコレステロール低下能画分の特定については多くの研究がなされている。菅野ら(Atherosclerosis, 72, 115, 1988 及び J. Nutr., 120, 977, 1990)は、血中コレステロール濃度低下効果には、大豆タンパク質の消化過程が深く関わっていると、大豆タンパク質のペプシンあるいは、微生物プロテアーゼによる消化に際して得られる非消化性画分は、き

わめて顕著な降コレステロール作用を発揮することをラットによる *in vivo* での研究で確認してきた。*in vitro* での研究ではあるが、岩見ら(大豆たん白質研究会会誌, 15, 74, 1994)は、血中コレステロールが、前駆体となっている胆汁酸との結合ペプチドが大豆タンパク質の主要構成成分のひとつである11Sグロブリンに存在し、さらにその構成成分である酸性サブユニット中のアミノ酸14残基からなるペプチドである可能性を示した。

【0004】しかしながら、11Sグロブリンを含め大豆蛋白質はフィチン酸との複合体を形成し、大豆蛋白質の消化性を阻害していることが知られている。(リターら, J. Food Sci., 52, 325, 1987)従って、大豆蛋白質から11Sグロブリンを効率よく精製し、かつ複合体として結合しているフィチン酸を分解、除去することは、血中のコレステロール低減剤として安全性のきわめて高い医薬品素材としてだけでなく、食品用素材として利用する上で重要な因子である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、大豆蛋白質中の血中のコレステロール低下能を有している画分を分画して、さらにその効果を高める処理を施すことで、食品あるいは医薬品として提供することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、鋭意検討の結果、次のことを見出した。

(1) 脱脂大豆より、大豆蛋白質成分の一般的な分画法であるタン・シバサキらによる方法によって11Sグロブリンを分画する場合、還元剤を使用せずとも70%以上の純度にまで分画出来る。

(2) 上記11Sグロブリンと同時に精製した7Sグロブリン、さらに上記11Sグロブリンに結合したフィチン酸を分解、除去したものを、カゼインを比較対照としたラットを用いた3週間の動物実験により、血中のコレステロール低減能は、11Sグロブリンおよびフィチン酸が分解、除去された低フィチン11Sグロブリンにのみ存在し、低フィチン11Sグロブリンが最大の血中のコレステロール低減能を有していた。

(3) さらに、大豆蛋白質をフィチン酸分解酵素で処理することにより、フィチン酸が分解、除去された低フィチン11Sグロブリンが分画される。かくして、血中の中性脂肪低減能を有するとされる11Sグロブリンからフィチン酸を分解、除去することで、その効果が向上することが判明し、その分投与量は少量で澄むことが期待できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】本発明は、11Sグロブリンを主成分とした低フィチン酸大豆蛋白質を有効成分とする血中コレステロール低減用組成物を提供するものである。また、大豆蛋白質を分画し、蛋白質純度として11Sグロブリンを70%以上で分画された11Sグロブリンを主成分とする大豆蛋白で、さらに、フィチン含量を蛋白質当たり

0.2%以下まで分解、除去した低フィチン酸11Sグロブリンを有効とする血中コレステロール低減用組成物を提供するものである。さらに分画の手段として、大豆蛋白質にフィチン酸分解酵素を作用させることで、11Sグロブリンを主成分とし、さらにフィチン含量を蛋白質当たり0.2%以下まで分解、除去した低フィチン酸11Sグロブリンを有効成分とする血中コレステロール低減用組成物を提供するものである。また、育種技術により11Sグロブリンを種子中の全蛋白質量の60%以上含む大豆より作製した大豆蛋白質を主成分とし、さらにフィチン酸含量を蛋白質当たり0.2%以下まで分解、除去した低フィチン酸11Sグロブリンを有効成分とする血中コレステロール低減用組成物を提供するものである。また、上記製造工程において還元剤を添加しないで作製された血中コレステロール低減用組成物を提供する。

【0008】

【発明の実施の形態】本明細書において、11Sグロブリンとは、一般に可溶性の球状蛋白質の総称であるグロブリンの中、分子量の超遠心沈降係数が11Sに相当するものを言う。グロブリンにはその分子量分布で2S、7S、11S、15Sが存在し、そのうち、7Sと11Sが大豆の様な豆科植物の貯蔵蛋白質には多量に含まれていることが知られている。なお、大豆の11Sグロブリンはグリシニンとも言われている。本発明においては、大豆蛋白質から分画した11Sグロブリンの含量の高い画分を主成分として用いる。大豆蛋白質から11Sグロブリンのするには、現在11Sグロブリンの分画方法として広く用いられているタン・シバサキの方法(Thahn, V.H., and Shibasaki, K., J. Agric. Food Chem., 24, 117, 1976) はもちろん、その他いわゆるクリオプレシテーション(Briggs, D.R., and Mann, R.L., Cereal Chem, 27, 243, 1950) による冷却不溶区分(Cold-insoluble-fraction/CIF. と呼ばれる) や、ウルフらによる(Wolf, W.J., and Sly, D.A., Cereal Chem, 44, 653, 1967) 0.1N塩化カルシウム添加による分画法いずれの分画法によっても良い。上記いずれかの方法により11Sグロブリンを分画するが、この際、還元剤は用いずとも十分に使用に耐えうる純度の11Sグロブリンが分画でき、さらにコレステロール低減剤として使用する場合も、還元剤を含まない方がより広い範囲の用途が期待できる。さらに得られた11Sグロブリンを主成分とする画分に、フィチン酸分解活性を有するフィターゼやホスファターゼのような酵素または、酵素剤を作用させ、フィチン酸を分解、除去することで、11Sグロブリンが本来有している血中のコレステロール低減能を高める。

【0009】このフィチン酸が分解、除去された低フィチン11Sグロブリンを分画する方法として、大豆蛋白質に直接フィチン酸分解活性を有するフィターゼやホス

ファターゼのような酵素または、酵素剤を作用させることで、低フィチン11Sグロブリンを得ることも可能である。

【0010】また、本発明においては、別法として、育種技術により11Sグロブリンを種子中の全タンパク質量の60%以上含む大豆から脱脂大豆を作製し、そこから還元剤を使用しないこと以外は通常の分離大豆蛋白質の作製方法によって作製された、純度70%好ましくは80%以上の11Sグロブリンを主成分として使用する。この場合も上記同様還元剤は用いずとも十分に使用に耐えうる純度の11Sグロブリンが取得でき、コレステロール低減剤として使用する場合も、還元剤を含まない方がより広い範囲の用途が期待できる。さらに得られた11Sグロブリンを主成分とする画分に、フィチン酸分解活性を有するフィターゼやホスファターゼのような酵素または、酵素剤を作用させ、フィチン酸を分解、除去することで、11Sグロブリンが本来有している血中のコレステロール低減能を高める。

【0011】本発明の組成物は、得られた画分や分離大豆蛋白質を有効成分として経口投与用の組成物とすることができ、例えば、自体公知の方法に従って粉末状、糖衣錠、顆粒状等の剤形の組成物とすることができ、適宜、他の賦形剤、添加剤を添加することができる。本発明の有効成分として用いる画分や分離大豆蛋白質は食用として使用できる安全なものであり、組成物への配合量、摂取量は特に限定するものではなく、そのまま摂取しても、また、食餌療法として食品に添加してもよい。

【0012】

【実施例】以下に、本発明の有効性を実施例と共に示すが、これらの例示によって本発明の技術思想が限定されるものではない。

製造例1 (低フィチン11Sグロブリンの調製(その1))

脱脂大豆に1:1.0の重量割合で水を加え、随時pHを7.0に調整しながら1時間攪拌し、この混合物を遠心分離(4,000r.p.m., 20℃で10分間)し、得られた上澄液をpH6.4に調整して、4℃にて一晩放置して、遠心分離(4,000r.p.m., 4℃で10分間)して得られた沈殿物を回収した。さらにこの沈殿物に4倍量の水を加え、pH6.0に調整後、フィターゼ(フィターゼノボL:ノボインダストリー社製)を蛋白質当たり0.2%添加後、40℃で1時間反応させた。この反応液をpH6.2に調整後、遠心分離(4,000r.p.m., 20℃で10分間)してホエー画分を除き、得られた沈殿物に加水後、pH7.0に中和して殺菌し、噴霧乾燥して低フィチン11Sグロブリンを得た。このようにして得られた低フィチン11Sグロブリンはフィチン酸含量が蛋白質当たり0.05%であり、フィチン酸がほぼ完全に分解、除去されていることを確認した。

【0013】製造例2（低フィチン11Sグロブリンの調製（その2））

脱脂大豆に1：10の重量割合で水を加え、随時pHを7.0に調整しながら1時間攪拌し、この混合物を遠心分離（4,000r.p.m., 20℃で10分間）し、得られた上澄液をpH6.0に調整して、フィターゼ（フィターゼノボル：ノボインダストリー社製）を蛋白質当たり0.2%添加後、40℃で1時間反応させた。この反応液をpH6.2に調整後、遠心分離（4,000r.p.m., 20℃で10分間）して得られた沈殿物に加水後、pH7.0に中和して殺菌し、噴霧乾燥して低フィチン11Sグロブリンを得た。このようにして得られた低フィチン11Sグロブリンはフィチン酸含量が蛋白質当たり0.05%であり、フィチン酸がほぼ完全に分解、除去されていることを確認した。

【0014】比較製造例1（11Sグロブリンの調製）
脱脂大豆に1：10の重量割合で水を加え、随時pHを7.0に調整しながら1時間攪拌し、この混合物を遠心分離（4,000r.p.m., 20℃で10分間）し、得られた上澄液をpH6.4に調整して、4℃にて一晩放置して、遠心分離（4,000r.p.m., 4℃で10分間）して得られた沈殿物を回収した。さらに

この沈殿物に加水後、pH7.0に中和して殺菌し、噴霧乾燥して粉体化した11Sグロブリンを得た。このようにして得られた11SグロブリンをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、その後染色された蛋白質のバンドの染色度の測定から、純度として85.4%あり、以下の検討に十分耐えうる純度であることを確認した。さらにこのもののフィチン酸含量を測定したところ、蛋白質当たり1.10%であった。

【0015】比較実施例1（ラットによる血中コレステロール低減効果確認試験）

ラットによる血中コレステロール低減効果の確認試験を行った。試験飼料として、上記製造例2にてそれぞれ得られた各大豆蛋白質成分と、さらに比較対照としてカゼイン（ビタミンフリーカゼイン、オリエンタル酵母（株）製）をそれぞれ食餌蛋白質として20%含み、コレステロール0.5%とコル酸ナトリウム0.125%を添加し、さらにシュクロースとコーンスターチの混合比率を1：2としたものを用いた。具体的配合を下記表1に示す。

【0016】

【表1】 各試験群の飼料組成

単位；%		
試験群	カゼイン	11Sグロブリン
カゼイン	22.5	-
11Sグロブリン	-	21.1
シュクロース	20.0	20.0
コーン油	5.0	5.0
ビタミンミックス	1.0	1.0
ミネラルミックス	3.5	3.5
セルロース粉末	5.0	5.0
酒石酸水素コリン	0.2	0.2
コレステロール	0.5	0.5
コル酸ナトリウム	0.125	0.125
α-コーンスターチ	42.175	43.575

【0017】実験動物は5週齢のウィスター系雄ラット（体重90～110g程度のもの）を日本SLCより購入し、市販固形資料（オリエンタル CRF-1）で1週間予備飼育した後、各試験資料群の体重が揃うように1群6匹で計3群に分け、試験資料で3週間飼育した。

飼育はラットを個別ケージに1匹ずつ入れ、温度23±1℃、湿度55±5%で12時間明暗サイクル（AM

7：00からPM7：00まで照明）の下で行った。飼育期間中は水および資料を自由摂取させた。

【0018】試験期間は21日間とし、その期間の体重の増加を測定し、下記表2の結果を得た。なお、各試験間の体重の増加量に有意差は認められなかった。

【0019】

【表2】 各試験群の体重の推移

単位；g		
試験群	カゼイン	11Sグロブリン
試験開始時	151.0±1.3	151.1±0.8
試験終了時	243.8±1.6	248.1±4.3
体重増加量	92.7±1.5	97.1±4.1

【0020】21日間の試験食終了後、22日目の朝（AM8:00）より6時間絶食し、ネンブタール麻酔下で開腹後、ヘパリン処理した注射器で腹部大動脈より採血した。血液から遠心分離（3,000r.p.m., 5℃で10分間）にて血漿を分離し、コレステロ

ールを測定した。測定値については群毎に平均値と標準偏差を算出し、有意差の検定はDuncan's multiple range testによって行った。その結果を以下の表3に示す。

【0021】

【表3】 各試験群の血中コレステロール量の推移

サンプル	カゼイン	11Sグロブリン	
総コレステロール量	118.7±4.5	104.3±4.3	単位; mg/dl
コレステロール低下率	-	-12.1	単位; %

【0022】比較実施例1（ラットによる血中コレステロール低減効果確認試験）

実施例1と同様にして、ラットを用いて血中コレステロール低減効果の確認試験を行った。試験飼料としては、実施例1と同様な組成をもつものを使用し、ただし、大豆蛋白質成分としては比較製造例1で得られたものを使用した。

【0023】実験動物は5週齢（成長期）のウィスター系雄ラット（体重100～120g、330～360g程度のもの）を日本SLCより購入し、市販固形資料（オリエンタル CRF-1）で1週間予備飼育した

後、各試験資料群の体重が揃うように1群6匹で計2群に分け、試験資料で10日間飼育した。飼育はラットを個別ケージに1匹ずつ入れ、温度23±1℃、湿度55±5%で12時間明暗サイクル（AM7:00からPM7:00まで照明）の下で行った。飼育期間中は水および資料を自由摂取させた。試験期間は10日間とし、その期間の体重の増加を測定し、下記表4の結果を得た。なお、各試験間の体重の増加量に有意差は認められなかった。

【0024】

【表4】 各試験群の体重の推移

試験群	カゼイン	低フィチン11Sグロブリン	単位; g
試験開始時	153.3±1.3	153.8±1.0	
試験終了時	201.7±2.2	205.6±1.2	
体重増加量	48.4±1.3	51.8±1.7	

【0025】10日間の試験食終了後、11日目の朝（AM8:00）より7時間絶食し、ネンブタール麻酔下で開腹後、ヘパリン処理した注射器で腹部大動脈より採血した。血液から遠心分離（3,000r.p.m., 5℃で15分間）にて血漿を分離し、コレステロ

ールを測定した。測定値については群毎に平均値と標準偏差を算出し、有意差の検定はDuncan's multiple range testによって行った。その結果を以下の表5に示す。

【0026】

【表5】 各試験群の血中コレステロール量の推移

サンプル	カゼイン	低フィチン11Sグロブリン	
総コレステロール量	144.1±6.0	102.6±4.7	単位; mg/dl
コレステロール低下率	-	-29.8	単位; %

【0027】製造例2の低フィチン11Sグロブリンとカゼインを比較すると、比較製造例1の11Sグロブリンよりも製造例2の低フィチン11Sグロブリンの方が著しく高いコレステロール低減効果を有していることが明らかとなった。

【0028】

【発明の効果】以上記載したごとく、血中コレステロール濃度を効率的に低減せしめることができ、しかも安全性がきわめて高いので、本発明の組成物は血中コレステロールの濃度低減のための予防ないし、治療剤として有用であるだけでなく、そのための飲食品として供することが出来る。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	キーワード (参考)
A 6 1 P 3/06		A 6 1 K 37/04	
// A 2 3 J 3/16		37/18	
(72)発明者 青山 敏明		F ターム (参考)	4B018 MD20 MD58 MD90 ME04 MF01
大阪府泉佐野市住吉町1番地 不二製油株			MF12
式会社阪南研究開発センター内			4C084 AA02 BA44 CA15 DA38 NA06
(72)発明者 橋本 征雄			NA07 ZC332
大阪府泉佐野市住吉町1番地 不二製油株			4C088 AB61 BA09 BA16 BA21 CA05
式会社阪南研究開発センター内			CA11 CA12 CA25 MA52 NA11
(72)発明者 鬼頭 誠			NA14 ZC33
京都市左京区下鴨下川原町46-72			